Über die Verdauung des Clupeins durch Papayotin.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde einer

Hohen Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Hanns Schuberth

aus München

im Juni 1936.

Kallmünz

Buchdruckerei von Michael Laßleben

1936

Referent: Professor Dr. Walther Borsche.

Tag der mündl. Prüfg. 29.6.36

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Vorliegende Arbeit wurde vom 1. Oktober 1934 bis 30. März 1935 im chemischen Laboratorium der II. medizinischen Universitätsklinik in München und vom 1. April 1935 bis Ende März 1936 im Institut für veget. Physiologie der Universität Frankfurt am Main auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Kurt Felix ausgeführt.

Auch an dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer für die Überlassung dieser Arbeit, sowie für die vielseitigen Anregungen und die liebenswürdige Unterstützung bei ihrer Ausführung meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552326_0066

Allgemeiner Teil.

Die Protamine lenken aus verschiedenen Gründen unser Interesse auf sich. Sie sind die einfachsten Eiweißkörper, die wir kennen. Bei relativ kleinem Molekulargewicht sind sie noch dazu nur aus wenigen Aminosäuren aufgebaut. Es ist verständlich, daß sich an diese Befunde die Erwartung knüpfen muß, durch das Studium der Protamine wichtige Gesichtspunkte für die Aufklärung der Konstitution der Eiweißkörper zu erlangen.

Protamine sind wesentliche Bausteine des Kerns der Spermatozoen vieler Fische und damit wohl Träger äußerst wichtiger biologischer Funktionen. Sie fehlen im Pflanzenreich und auch bei höheren Tieren konnte man sie noch nicht nachweisen. Aus dem Studium der Entstehung von Protaminen im Organismus von Salmoniden ergab sich, daß typische Proteine im Laufe der Spermatogenese zu Protaminen umgeformt werden. (F. Weiß H. 52. 107. 1907.) Bisher ist kein Spaltungsprodukt der Protamine bekannt, das nicht auch in den typischen Proteinstoffen vorkommt. Auch die Art der Verkettung ist die gleiche. Das beweist besonders das Verhalten gegenüber proteolytischen Fermenten. (Kossel H. 25. 165. 1898.)

Das wohlfeilste und noch am besten untersuchte Protamin ist das aus den Heringsspermatozoen gewonnene Clupein. Nach erfolgter Totalhydrolyse fand Kossel, daß der Hauptbestandteil Arginin ist, welches allein ca. 88% des Gesamtstickstoffs vom Clupein enthält. Der übrige Stickstoff kommt den bis jetzt gefundenen Monoaminosäuren: Alanin, Serin, Valin, Prolin und Oxyprolin zu.

Nach Ermittlung der das Clupein aufbauenden Aminosäuren lag es nahe, daß man versuchte durch partielle Hydrolyse Produkte zu erhalten, bei denen noch Verknüpfungen von Aminosäure zu Aminosäure vorhanden waren, also Di-, Tri- und Polypeptide, um dann an deren Aufbau weiter Aufschluß über die Verkettung der Bausteine des Clupeins zu erhalten.

Partielle Hydrolyse wurde auf verschiedenen Wegen erreicht. Es wurde in dieser Absicht die Säurehydrolyse angewandt, wobei im geeigneten Augenblick weitere Spaltung verhindert wurde. So gelang es K. Felix u. K. Dirr nach 14tägiger Einwirkung von 50%iger H_2SO_4 auf Clupeinmethylesterchlorhydrat bei 37° C. aus der Lösung das Dipeptid Arginyl-Arginin zu isolieren. Nach teilweiser Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure konnten K. Felix, R. Hirohata & K. Dirr (H. 218. 268. 1933) ein Tetrapeptid nur aus Arginin bestehend er-

halten. Ein anderes, schonenderes Verfahren der partiellen Hydrolyse stellt die Spaltung durch Fermente dar. Nach erfolgter Trypsinverdauung des Clupeins isolierten K. Felix, K. Inouje & K. Dirr (H. 211. 187. 1932.) 5 verschiedene Dipeptide: Arginyl-Arginin, Arginyl-Oxyprolin, Arginyl-Alanin, Arginyl-Serin und Arginyl-Valin, oder Alanyl-Arginin, Seryl-Arginin und Valinyl-Arginin. Die Art der Verkettung konnte hierbei noch nicht festgestellt werden.

Waldschmidt-Leiz suchte durch fraktionierten enzymatischen Abbau Aufklärung über die Struktur des Clupeins. Er ließ auf das von ihm besonders gereinigte Clupeinsulfat Protaminase aus Pankreas einwirken. (H. 197. 219. 1931. H. 236. 190. 1935.) Er erhielt dabei nur Abspaltung von Arginin und zwar am Carboxylende des Protamins. Das so erhaltene Clupean baute er weiter durch aktiviertes Trypsin ab. Die erhaltenen Spaltprodukte wurden auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit im wässrigen Alkohol auffraktioniert, bis Fraktionen erhalten wurden, in denen das Verhältnis von Gesamtstickstoff zu α-Aminostickstoff ungefähr constant blieb. Auf Grund des Verhältnisses N : NH schließt Waldschmidt-Leitz auf das Vorliegen von Di- und Tripeptiden. Die Fraktionen wurden nun durch Einwirkung von Dipeptidase, Carboxypeptidase und Arginase von ihm weiter untersucht.

Über die Frage wie weitgehend die Hydrolyse durch die einzelnen Fermente getrieben wird, vermag das Prozentverhältnis von van Slyke-Stickstoff zu Gesamtstickstoff Aufschluß zu geben. Nach der Einwirkung von Protaminase auf Clupeinsulfat ergab sich 1% Aminostickstoff. (E. Waldschmidt-Leitz H. 197. 219. 1931.) Das dabei erhaltene Clupean wurde der Hydrolyse mit aktiviertem Trypsin unterworfen. Der α-Aminostickstoff betrug dann 12% vom Gesamtstickstoff. (E. Waldschmidt-Leitz H. 236. 190. 1935.)

Aus dem Verdauungsgemisch von Clupein mit aktiviertem Trypsin erhielten K. Felix, K. Inouje & K. Dirr (H. 211. 187. 1932.) im wesentlichen wohl definierte Dipeptide. Es war nun von Interesse ein Ferment zur Clupeinspaltung in Anwendung zu bringen, das vielleicht zu anderen Baueinheiten führte. Dies schien durch das pflanzliche, peptische Ferment Papain aus carica papaya erreicht zu werden. Aus diesen Erwägungen heraus wurden die Versuche zur Verdauung von Clupein durch Papain durchgeführt.

Darstellung des Clupeinpräparates:

1.) Darstellung des Nucleoprotamins:

Zur Darstellung des Nucleoprotamins wurden die ausgereiften Heringstestikel in der Fleischhackmaschine zerkleinert, im Wasser durch kräftiges Turbinieren suspendiert und dann koliert. Aus dem Filtrat wurde dann das Nucleoprotamin durch die eben nötige Menge Eisessig gefällt. Es wurde nochmals turbiniert und dann filtriert. Der Niederschlag wurde noch einmal mit 1% iger Essigsäure, darauf mit bloßem Wasser aufgerührt und filtriert. Das erhaltene Präparat wurde, wenn es nicht gleich weiter verarbeitet wurde, in Aceton suspendiert, filtriert, dann mit Äther nachgewaschen und an der Luft getrocknet. Man erhielt so ein fast weißes, schön pulverisierbares Produkt.

2.) Darstellung des Clupeinpikrates:

Zur Herstellung des Clupeinpikrates aus dem Nucleoprotamin wurde dieses nach Quellung in n/20 NaOH drei- bis sechsmal je 30 Min. lang mit 1% iger H_2SO_4 turbiniert und filtriert. Die fast ganz klaren Filtrate enthielten das Clupein in Form des Sulfates gelöst. Es wurde nun mit einer kaltgesättigten Lösung von Natriumpikrat versetzt, bis auf erneuten Zusatz keine Fällung mehr eintrat. Nach dem Absitzen wurde der Niederschlag auf der Nutsche abgesaugt und mit Wasser gut nachgewaschen.

Da sich zeigte, daß das so erhaltene Clupeinpikrat noch recht unterschiedliche Mengen an Purinkörpern enthielt, wurde das folgende Verfahren zu deren Entfernung angewandt:

Das ausgewaschene und noch feuchte Clupeinpikrat wurde mit soviel n/20 NaOH verrieben, bis die Reaktion deutlich lackmusalkalisch war. Darauf wurde sofort abgesaugt und noch zweimal mit der gleichen Menge n/20 NaOH extrahiert. Es zeigte sich, daß bei der dritten Extraktion gewöhnlich kaum mehr etwas in Lösung ging. Zum Schluß wurde nun das Clupeinpikrat nochmals mit Wasser, dann mit n/20 HCl zur völligen Entfernung der Lauge gewaschen. Nachdem dann noch mit Wasser nachgewaschen war, wurde das Präparat an der Luft getrocknet.

Das auf diese Weise gereinigte Clupeinpikrat wurde nach einer von K. Felix und K. Dirr (H. 184. 120. 1929.) angegebenen, nun etwas abgeänderten Methode in das Chlorhydrat des Methylesters übergeführt.

3.) Darstellung des Clupeinmethylesterchlorhydrates:

Das getrocknete und fein pulverisierte Clupeinpikrat wurde in abs. Methylalkohol suspendiert und durch Einleiten von getrocknetem HCl unter Eiskühlung, verestert. Nach einigem Stehen wurde durch eine Glasfilternutsche abgesaugt. Der gelblich-weiße Niederschlag wurde nun in abs. Methylalkohol gelöst und in HCl-haltigem Äther eingegossen. Die erhaltene, fast weiße Fällung wurde wiederum nach kurzem Absitzen abgesaugt. Das Lösen in abs. Methylalkohol und Fällen mit HCl-haltigem Äther wurde, um ein möglichst weiß aussehendes Produkt zu erhalten, noch ein- bis zweimal wiederholt. Zum Schluß wurde noch mit abs. Äther gewaschen und über $CaCl_2$ im Vakuum getrocknet. Das so erhaltene Produkt ließ sich zu einem weißen Pulver zerreiben.

Aus dem ersten bei der Veresterung erhaltenen Filtrat ließ sich durch Fällen mit abs. Äther ein Körper gewinnen, der nach Reinigung durch abermaliges Lösen im Methylalkohol und Fällen mit HCl-haltigem Äther eine viel höhere Methoxylzahl aufwies, wie das gewonnene Clupeinmethylesterchlorhydrat. Es ergab sich ein Methoxylgehalt von 1,95% gegenüber 0,598% beim eigentlichen Clupeinpräparat. Wenn jeweils am Ende des Moleküls eine veresterbare Carboxylgruppe steht, so ist aus diesem zu schließen, daß der Körper somit auch ein bedeutend kleineres Durchschnittsmolekulargewicht wie das letztere Produkt hatte.

Charakterisierung des Clupeinmethylesterchlorhydrates:

Gewichtsverlust beim Trocknen 5,94%.

Analysenergebnisse des trockenen Präparates:

Gesamtstickstoff (Kjeldahl-Bestimmung): 24,85%.

Nach erfolgter Totalhydrolyse ergab sich an van Slyke-Stickstoff (α-Aminostickstoff) in % vom Gesamtstickstoff: 32,3%.

Chlorgehalt (Bestimmung nach Carius): 15,97%.

Methoxylgehalt: 0,598%.

Für die Annahme, es liege ein Produkt von einheitlichen Molekülen vor, an deren einem Ende sich jeweils eine veresterbare Carboxylgruppe befindet, ergibt sich aus obigem Analysenergebnis für das wasserfreie Chlorhydrat des Methylesters ein Molekulargewicht von: 5052.

Frühere nach der von K. Felix und K. Dirr (H. 184. 111. 1929) angegebenen Methode hergestellte Clupeinpräparate ergaben auf Grund der Methoxylzahl immer bedeutend kleinere Molekularge-

wichte. Es ist dies wohl auf die etwas andere Methodik der Herstellung zurückzuführen.

Auf Grund der Protaminasewirkung auf Clupein berechnet Waldschmidt-Leitz (H. 197. 222. 1931.) für sein Clupeinsulfat das Mindestmolekulargewicht zu 2021. Die Molekulargewichtsbestimmung mittels der Ultrazentrifuge nach Th. Svedberg und B. Sjögren hat gar nichts ergeben, weil die Größe des Clupeinmoleküls unterhalb der Bestimmungsgrenze der Ultrazentrifuge liegt. K. E. Rasmusen und Linderström-Lang (H. 227. 181. 1934.), erhielten durch potentiometrische Titration der freien Carboxylgruppe für das von ihnen dargestellte Clupeinsulfat, sowie für das von Waldschmidt-Leitz dargestellte Präparat Molekulargewichte von 4000 bis 4100, also ungefähr das Doppelte der von Waldschmidt-Leitz gefundenen Werte. Durch Bestimmung der reaktionsfähigen Aminogruppen nach van Slyke gelangte dann auch Waldschmidt-Leitz ungefähr zu diesem Molekulargewicht.

Die Filtrate der Clupeinpikratreinigung durch Extraktion mit n/20 NaOH setzten oft schon beim bloßen Stehen an der Luft einen kristallinen Niederschlag ab. Sofort erhielt man Fällung beim Ansäuern mit n/1 HCl. Der flockige, oft auch kristalline Niederschlag war von rein gelber Farbe. Es wurde abgesaugt und nach dem Waschen mit Wasser an der Luft getrocknet. Das so erhaltene Produkt ließ sich leicht zu einem Pulver von ganz anderer Konsistenz wie Clupeinpikrat zerreiben.

Für die qualitative Untersuchung dieses Pikrates wurde mit 50%iger Schwefelsäure verrieben bis zur Lösung, dann im Soxhlet-Apparat mit Äther alle Pikrinsäure entfernt. Darauf wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und zur Totalhydrolyse 16 Stunden am Rückflußkühler gekocht.

Aus diesem Hydrolysat wurde nach einer von Krüger und Schittenhelm (H. 45. 23. 1905.) angegebenen Fällung mittels Kupfersulfat und Natriumbisulfit die Purinkörper abgetrennt. Es wurde zu diesem Zwecke die Lösung mit conz. Ammoniak schwach alkalisch gemacht, dann mit 40%iger Natriumbisulfitlösung angesäuert. Nun fügte man 10%ige Kupfersulfatlösung zu und hielt die Flüssigkeit noch drei Minuten im Sieden. Nach völliger Abkühlung wurde der grünlichbraune Niederschlag abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Um nun aus dem Niederschlag die Purine wieder in Lösung zu bekommen, wurde er in verdünnter H_2SO_4 suspendiert und in der Siedehitze Schwefelwasserstoff eingeleitet bis alles Kupfer als Sulfid gefällt war. Es wurde dann abfiltriert. Das gelbliche Filtrat ergab sehr starke Murexidreaktion. Die Lösung wurde nun systematisch auf Guanin, Adenin, Hypoxanthin und Xanthin untersucht.

1) Guaninfällung:

Zur Guaninfällung wurde die Lösung mit conz. Ammoniak im Überschuß versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Es trat keine Fällung ein.

2) Adeninfällung:

Die ammoniakalische Lösung wurde nun zur Entfernung des überschüssigen Ammoniaks weitgehend eingedampft, dann mit etwas Wasser verdünnt und nach Zusatz eines Tropfens wässriger Methylorangelösung tropfenweise mit Salzsäure versetzt, bis zum Auftreten einer Rotfärbung. Es wurde nun eine kaltgesättigte Lösung von Natriumpikrat zugesetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfiel. Die entstandene recht bedeutende Fällung wurde dann sofort abgesaugt. Der Niederschlag wurde nun aus heißem Wasser umkristallisiert. Man erhielt dabei ziemlich lange büschelförmige Kristallnadeln, die bei 100° C. getrocknet wurden. Das Pikrat hatte den Zersetzungspunkt von 281° C, löste sich sehr leicht in Alkalilösung oder Ammoniak und fiel aus der Lösung mit Säure wieder aus, was für Adeninpikrat charakteristisch ist.

3) Abtrennung vom Hypoxanthin:

Das Filtrat der Adeninpikratfällung wurde mit Salpetersäure angesäuert und die Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Benzol entfernt. Es wurde nun wieder mit Ammoniak stark alkalisch gemacht und mit ammoniakalischer Ag-Lösung versetzt. Man erhielt eine recht starke Fällung. Nach 2 stündigem Stehen wurde abgesaugt, mit wenig Wasser nachgewaschen und der Niederschlag im Wasser suspendiert. Man erhitzte nun zum Sieden und fügte tropfenweise Salzsäure zu, bis kein AgCl mehr ausgeschieden wurde. Nun fügte man noch einen kleinen Überschuß an HCl zu und saugte nach kurzem Absitzen ab. Die so erhaltene Lösung von Purinbasen wurde dann auf dem Wasserbad zum Trocknen eingedampft und mehrere Male zur Entfernung der HCl mit Wasser und Alkohol eingedunstet. Sodann wurde in wenig Wasser in der Wärme gelöst und die Lösung zur Ausscheidung des Xanthins 24 Stunden stehen gelassen. Man erhielt dabei keine Xanthinausscheidung.

4) Hypoxanthinnachweis:

Die Lösung wurde nun mit Wasser verdünnt und mit einer gesättigten Lösung von Pikrinsäure versetzt, bis keine Fällung mehr eintrat. Nun wurde noch ein Überschuß des Fällungsmittels zugegeben und durch Erhitzen die ganze Fällung in Lösung gebracht. Man ließ langsam abkühlen und erhielt schöne, büschelförmige Kristallnadeln. Es wurde abgesaugt, aus heißem Wasser umkristallisiert und bei 100° C getrocknet. Die Kristalle hatten den

Zersetzungspunkt bei 281° C, und erwiesen sich als Adeninpikrat, das eben bei der obigen Fällung nicht mit erfaßt worden war. Die vom Adenin befreite Lösung schied beim Einengen und nachherigem Stehen über Nacht wenig makroskopische, tafelförmige Kristalle von Hypoxanthinpikrat aus.

Um zu sehen, ob das Filtrat des Hypoxanthinpikrats noch Xanthin enthielt, wurde die Lösung wiederum mit HNO_3 angesäuert und mit Benzol die Pikrinsäure extrahiert. Die Lösung wurde dann stark ammoniakalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Man erhielt keine Fällung von Xanthin.

Etwas vom Filtrat der Sulfitfällung wurde auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft, mit Soda und Salpeter verrieben und im Porzellantiegel zusammengeschmolzen, bis aller ausgeschiedener Kohlenstoff verbrannt war. Darauf wurde im siedenden Wasser gelöst, filtriert, und mit Salzsäure eben angesäuert. Mit Ammonmolybdatreagenz erhielt man dann eine recht beträchtliche Phosphorsäurefällung.

Ein andrer Teil des Filtrates der Sulfitfällung wurde mit Schwefelsäure angesäuert, die freie schwefelige Säure durch Kochen entfernt, sodann noch das darin enthaltene Kupfer mittels Schwefelwasserstoff gefällt und filtriert. Aus dem Filtrat wurde der Schwefelwasserstoff durch Kochen entfernt. Die so erhaltene Lösung ergab negative Sakaguchi-Reaktion auf Arginin; die Kreatininreaktion war positiv. Die Reaktion auf Pentosen und Glukuronsäure mittels Orcin-Salzsäure war in dieser Lösung negativ.

Die Untersuchung des aus dem rohen Clupeinpikrat mittels Lauge eluierten Körpers ergab somit nach Entfernung der Pikrinsäure und Totalhydrolyse sehr viel Adenin, etwas Hypoxanthin, recht beträchtliche Mengen Phosphorsäure und positive Reaktion auf Kreatinin.

Der Befund der Phosphorsäure ist nicht zu erklären. Man muß annehmen, daß sie nur beigemengt und nicht chemisch gebunden war.

Darstellung des Fermentpräparates.

Das für die Verdauung in Anwendung gebrachte Fermentpräparat wurde aus einem amerikanischen Rohpräparat, dem „Papayotin Wallerstein“ hergestellt.

Wie W. Graßmann festgestellt hat, ist dieses Präparat phosphatidhaltig. Zur Entfernung der Phosphatide wurde das „Papayotin Wallerstein“ mit Äther fein verrieben, zentrifugiert, dann der Äther abgegossen. Das Ganze wurde noch zweimal wiederholt und das Präparat im Vakuumexsikkator trockengesaugt.

Der mit Äther extrahierte Anteil war sehr phosphorsäurehaltig und ließ sich aus der ätherischen Lösung durch Aceton fällen, was für Phosphatide charakteristisch ist.

Nach W. Graßmann (C. Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen; Bd. 3 S. 1017.) bereitet die Reinigung des Papayotins ungewöhnliche Schwierigkeiten und ist mit Hilfe der Adsorptionsmethode und Verwendung der üblichen Adsorbentien bisher nicht in befriedigender Weise gelungen. Auch die Dialyse gibt nur sehr geringfügige Reinigung. Noch weniger befriedigend wird das Resultat der Reinigung, wenn man die durch die Alkoholfällung vorgereinigten Enzymlösungen der Adsorption unterwirft. Bei einer Adsorption von nur 50% des vorhandenen Enzyms zeigte die erhaltene Elution den gleichen Papainwert wie das angewandte vorgereinigte Präparat. (H. Kraut und E. Bauer H. 164. 10, 1926/27.)

Da somit noch keine Methode der wirklich starken Anreicherung des Papayotins bekannt ist, mußte man sich damit begnügen, ein Präparat herzustellen, von dem zumindest alle unlöslichen Anteile und zum größten Teil färbenden Substanzen entfernt waren. Es wurde dies durch die von E. M. Frankel (Jl. of Biol. Chem. 31. 201. 1917.) vorgeschlagene Acetonfällung erreicht, die vor der Alkoholfällung den Vorteil hat, daß sich die Fällung schön flockig und gut absetzt. Ich brachte nach verschiedenen Versuchen folgende Methodik in Anwendung:

Das durch die Ätherextraktion von den Phosphatiden befreite „Papayotin Wallerstein" wurde mit der 20 fachen Menge Wasser 30 Min. lang geschüttelt und einen Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es wurde dann filtriert und mit Aceton gefällt. Die schön flockige, weiße Fällung wurde nach kurzem Stehen abzentrifugiert. Der Niederschlag setzte sich dabei sehr gut ab. Es wurde nun mit 96%igem Alkohol aufgerührt und dann wiederum zentrifugiert. Zum Schluß wurde mit abs. Äther aufgenommen und nach dem Abschleudern der Niederschlag sofort im Vakuumexsikkator trockengesaugt. Man erhielt so ein weißes, pulverisierbares Produkt, das sich mit nur geringer Trübung im Wasser löste. Stickstoffgehalt: 11,12%.

In Versuchsreihen, die ich später unter Anleitung von Dr. E. Maschmann ausführte, wurde das so gereinigte Präparat in seiner Wirkung mit dem ungereinigten, ferner dem „Papain Merck 1 : 350", sowie mit einem von Dr. E. Maschmann durch die Fällung mit 80%igem Alkohol aus diesem gewonnenen Produkt verglichen. Das rohe Wallerstein'sche Präparat zeigte sich dem Papain 1 : 350 praktisch in der Wirkung gleichwertig. Der Vergleich des von Dr. E. Maschmann aus Papain Merck 1 : 350 durch die Alkoholfällung gereinigten Produktes mit dem nach obiger Vorschrift aus dem rohen

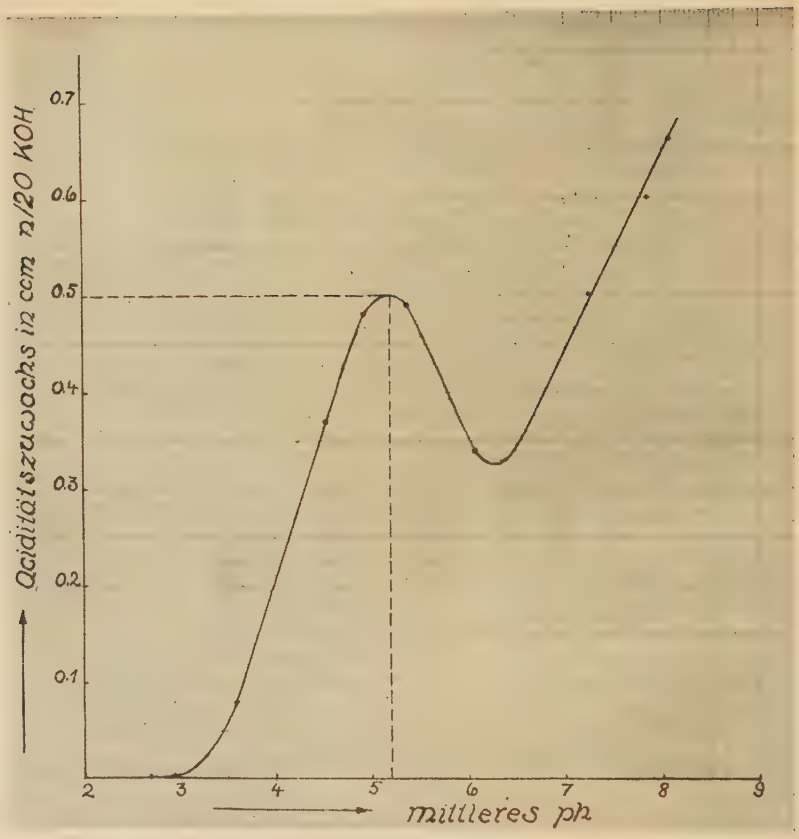
Papain Wallerstein erhaltene Präparat ergab völlige Gleichheit in den Verdauungswerten.

Im Folgenden waren die optimalen Bedingungen für die Verdauung von Clupein durch Papain ausfindig zu machen. Es galt zu bestimmen: Das optimale ph, Art und Menge des Aktivators, sowie die optimale Papainmenge.

1) Bestimmung des optimalen ph:

Die Literaturangaben über das optimale Wirkungsgebiet des Papayotins sind widersprechend. Nach A. Baginski (H. 7. 211. 1885.) liegt das Optimum im neutralen Gebiet. Nach O. Emmerling (C. B. Bd. 35. S. 695. 1902.) im schwach alkalischen, nach H. T. Gräber (Jl. of Ind. and Engin Chemistry Bd. 3. S. 919. 1911.) im sauren Gebiet. Genauer und mit neueren Mitteln (ph-Einstellung mit NaOH und HCl, Prüfung mit Indikatoren, Formoltitration) hat E. M. Frankel (Jl. of Biol. Chem. Bd. 8. S. 177. 1910.) die Abhängigkeit von der Acidität geprüft bei Gegenwart von HCN und ohne sie. Es ergab sich ein ausgesprochenes Optimum bei etwa ph-5 mit scharfem Abfall nach beiden Seiten. Zum gleichen Optimum gelangten Willstätter und W. Graßmann bei der Alkoholtitration mit Gelatine als Substrat. Es fiel auf, daß das so gefundene Optimum fast mit dem isoelektrischen Punkt der Gelatine zusammenfiel, der wiederum von S. C. Rawling und W. Clark (Jl. Chem. Soc. London Bd. 121. S. 2830. 1922.) bei ph-4.7 gefunden wurde. Man unterschied weiterhin die drei Proteasen Pepsin, Trypsin und Papain hinsichtlich des elektrochemischen Zustandes des Substrats bei ihrem ph-Optimum. Es sollte Pepsin Eiweiß-Kationen, das Trypsin Eiweiß-Anionen und das Papain nur das isoelektrische Eiweiß spalten. Der isoelektrische Punkt des Clupeins liegt nun bei etwa ph-12. Demnach sollte nach jener Anschauung das ph-Optimum des Papains für Clupein bei etwa ph-12 liegen.

Zur Ermittlung des optimalen ph wurden Verdauungsversuche angesetzt, die in 25 ccm Lösung 1 g Clupeinmethylesterchlorhydrat, 8,7 mg Papain und 10 mg Cystein als Aktivator enthielten. Durch verschiedene Mengen n/1 HCl bzw. n/1 NaOH wurde das ph auf verschiedene Werte eingestellt, die potentiometrisch gemessen wurden. Nach einstündiger Verdauung bei 40° C wurden Proben von je 2 ccm entnommen, um mittels der Willstätter'schen Alkoholtitration den Fortschritt der Verdauung zu ermitteln. Gleichzeitig wurde wiederum das ph gemessen und für den eigentlichen Wert das Mittel zwischen Anfangs-ph und dem nach einer Stunde gemessenen genommen. Die erhaltenen Werte ergaben folgende Kurve:



Wie die Kurve zeigt, liegt hier ein ausgesprochenes Optimum im saueren Gebiet, bei ph-5,2 vor, also mit dem von Waldschmidt-Leitz (H. 188. 34. 1930) für Kathepsin gefundenen Optimum zusammenfallend. Die Kurve fällt nach beiden Seiten steil ab, steigt aber im Alkalischen wieder weit über das im Saueren liegende Optimum an. Versuche, das im Alkalischen liegende Optimum genauer zu bestimmen, scheiterten einerseits daran, daß sich das ph bei der Hydrolyse ohne eigentlichen Puffer hier sehr stark verschiebt, anderseits, daß die gebräuchlichen Puffer in diesem Bereich nur höchst mangelhaft zu puffern vermögen. Es mag sein, daß dieses zweite Optimum dem isoelektrischen Punkt des Clupeins der nach Sugurn Miyake (H. 172. 224. 1927.) zwischen 12.13 und 12.16 liegt, sich nähert.

Ob die stark verdauende Wirkung im alkalischen Gebiet hier tatsächlich durch die Lage des isoelektrischen Punktes bedingt ist, ist fraglich. Es ist auch möglich, daß das Papain kein einheitliches Ferment ist und sich hier Überlagerungserscheinungen bemerkbar machen, die durch die Peptidasewirkung zum Vorschein kommen. Auf diese Weise könnte eine erhöhte Wirkung des Papains gegenüber dem Clupein im alkalischen Gebiet nur vorgetäuscht werden. Die hier bestehenden Verhältnisse bedürfen noch einer weiteren Klärung.

2) Bestimmung der Art und Menge des Aktivators:

Willstätter (H. 138. 184. 1924.) machte die erstaunliche Entdeckung, daß das Papain an sich eine reine Protease ist, daß sie aber die Fähigkeit zur Peptonspaltung erlangt, wenn man sie mit HCN aktiviert. Es entsteht dabei ein neues Ferment. Das Papaincyanhydrin ist eine reversible Verbindung vom Papain mit HCN. Es ist eine Peptidase, die nun eigentümlicherweise zwar „Peptone" weiter zerlegt, aber nur wenig Aminosäuren bildet und auf synthetische Polypeptide meist ohne Einfluß ist.

In Übereinstimmung mit Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner und W. Graßmann (H. 156. 87. 1926.) wurde festgestellt, daß nicht aktiviertes Papain im acetatgepufferten System mit Clupein als Substrat keine Hydrolyse verursacht.

Die wirksamsten und bekanntesten Aktivatoren für Papain sind: HCN, H_2S, sowie Cystein. Für die vorgesehenen Versuche blieb nun in Anbetracht der Methodik die Wahl zwischen HCN und Cystein.

Zur Bestimmung der optimalen Menge Cysteins als Aktivator, wurden Verdauungsversuche angesetzt, die verschiedene Mengen Cystein enthielten. Mit Acetat war auf ph-5,2 gepuffert. Nach 13 und 24 Stunden wurde der Fortschritt der Verdauung durch die Willstätter'sche Alkoholtitration bestimmt.

Es ergab sich als optimale Cysteinmenge etwa 50% der angewandten Fermentmenge.

In weiteren Versuchsansätzen wurde die Cysteinaktivierung mit der HCN-Aktivierung verglichen. Es wurden Versuche angesetzt, die als Aktivator in einem Ansatz die doppelt optimale Menge Cystein, in den anderen verschiedene Mengen HCN enthielten. Mit Acetat war auf ph-5,2 gepuffert. Da die HCN bei der Alkoholtitration nach Willstätter sehr störend wirkte, wurde hier der Fortschritt der Verdauung durch die van Slyke-Stickstoffbestimmung verfolgt.

Es sei zu diesen Versuchen erwähnt, daß nach Befunden von E. M. Frankel (J. of Biol. Chem. 8. 177. 1910.) und von R. Will-

stätter und W. Graßmann (H. 138. 184. und zwar S. 197. 1924.) das ph-Aktivitätsoptimum für Papain von der Natur des Aktivators unabhängig ist.

Nach den erhaltenen Ergebnissen scheint es so zu sein, daß bei höheren HCN-Konzentrationen die HCN-Aktivierung der Cysteinaktivierung überlegen ist. Da die HCN außerdem aus den Verdauungsansätzen sehr einfach durch bloßes Evakuieren bei saurer Reaktion völlig zu entfernen ist, ist diese als Aktivator bei Verdauungsansätzen, wo Isolierungsversuche folgen sollen, entschieden vorzuziehen.

3) Bestimmung der optimalen Papainmenge:

Zur Bestimmung der optimalen Papainmenge wurden Versuche angesetzt, die in 20 ccm Lösung 800 mg Clupeinmethylesterchlorhydrat, 10 mg Cystein als Aktivator und verschiedene Mengen einer Lösung, die im ccm 10,85 mg Ferment enthielt. Mit Acetatpuffer war auf ph-5,2 eingestellt. Der Fortschritt der Verdauung wurde nach $3^1/_2$ Stunden durch die Willstätter'sche Alkoholtitration bestimmt.

Es ergab sich, daß die optimale Papainmenge für 800 mg Clupeinmethylesterchlorhydrat bei 0,8 ccm der verwandten Papainlösung liegt. Das entspricht 8,68 mg Ferment, also ca 1% der Substratmenge.

Verdauung von Clupein unter den gefundenen optimalen Bedingungen:

100 gr Clupeinmethylesterchlorhydrat in 2000 ccm Lösung wurden mit 930 mg Papain unter HCN-Aktivierung und Pufferung mittels Natriumacetat und Essigsäure auf ph-5,3 64 Stunden lang bei 40^0 C verdaut, so daß erneuter Fermentzusatz keine weitere Spaltung mehr ergab. Der Fortschritt der Verdauung wurde an der Zunahme des freien α-Aminostickstoffs nach van Slyke verfolgt.

Nach der Verdauung zeigte der Ansatz leichte flockige Trübung; die Biuretreaktion war sehr stark positiv.

Die ganze Lösung wurde nun im Vakuum bei 12 mm Hg und 50^0 C Wasserbadtemperatur auf $^1/_3$ des Volumens eingeengt. Auf diese Weise wurde alle HCN entfernt. Wegen geringer Trübung wurde dann durch ein Faltenfilter filtriert und im Meßkolben auf einen Liter aufgefüllt. (Zur Haltbarmachung wurden einige Tropfen Chloroform zugesetzt und mit Toluol überschichtet.)

Analytische Ergebnisse:

Gesamtstickstoff in 1 ccm der Lösung: 23,268 mg. Freier Aminostickstoff nach van Slyke auf 1 ccm Lösung umgerechnet: 2,198 mg. = 9,45% vom Gesamt-N. Arginin-bestimmung in 5 ccm der Lösung (nach Totalhydrolyse durch Säure Fällung des Arginins als Flavianat nach A. Kossel und W. Staudt: H. 156. 270. 1926.): Man erhielt 0,92188 gr Argininflavianat, dies entspricht: 65,732 mg Arginin pro ccm Lösung = 21,155 mg Argininstickstoff pro ccm Lösung. Somit fielen 90,92% des Gesamtstickstoffs in der Lösung dem Arginin zu.

Nach erfolgter Totalhydrolyse des Clupeins wurden durch die α-Aminostickstoffbestimmung nach Van Slyke 32,3% vom Gesamtstickstoff erfaßt. Nach der fermentativen Spaltung durch Papain waren es 9,45%, also etwa $^1/_3$ des Wertes nach der Totalhydrolyse. Zu diesen α-Aminostickstoffbestimmungen ist zu bemerken, daß dadurch nicht die gesamte Spaltung erfaßt werden kann, da die frei gewordenen Prolin-Iminogruppen nicht mit salpetriger Säure reagieren.

Da das Clupein als weitaus vorherrschenden Bestandteil Arginin enthält, waren nach der Verdauung in der Hauptsache Arginin bezw. Polypeptide mit Arginin im Molekül zu erwarten. Da diese Körper durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, wurde diese Fällung benutzt, um sie von den anderen Monoaminosäuren und Monoaminosäurepeptiden zu trennen.

Abtrennung des Arginins bzw. der Argininpeptide aus dem Verdauungsgemisch mittels der PW-Säure:

Die verdünnte Lösung des Verdauungsgemisches wurde 5 Vol.%ig schwefelsauer gemacht, dann mit einer 20%igen PW-Säurelösung in 5 Vol.%iger Schwefelsäure gefällt, bis auf erneuten Zusatz des Fällungsmittels innerhalb 10 Sekunden keine Fällung mehr eintrat. Nach eintägigem Stehen wurde der dicke Niederschlag abgesaugt. Das erhaltene Filtrat gab nach erneutem Zusatz von 20%iger PW-Säurelösung und längerem Stehen erneut Fällung. Es wurde nun noch soviel Fällungsreagenz zugesetzt, bis keine Fällung mehr eintrat. Auch dieser Niederschlag wurde wie der vorhergehende abgesaugt.

Das erhaltene Filtrat wurde durch Ausschütteln mit einem Gemisch von Amylalkohol-Äther (1:1) von der überschüssigen PW-Säure befreit, dann mit Natronlauge neutralisiert und im Vakuum weitgehend eingedampft. Man ließ über Nacht stehen, wodurch ein großer Teil des durch die Neutralisation entstandenen Na_2SO_4

auskristallisierte. Es wurde davon abgesaugt und nach Waschen mit wenig Wasser das Filtrat im Vakuum zur völligen Trockne eingedampft. Schließlich wurde noch bei 100° C im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde zur Abtrennung des restlichen Na_2SO_4 mit abs. Methylalkohol verrieben, durch Einleiten von getrocknetem HCl verestert und abfiltriert. Das Ganze wurde noch zweimal wiederholt, dann die Filtrate vereinigt und von diesen bei 12 mm Hg und 30° bis 40° C Wasserbadtemperatur der ganze Alkohol weggedampft. Es wurde mit Wasser aufgenommen und nach Auffüllen im Meßkolben durch Kjeldahlbestimmung der Gesamtstickstoff der Lösung bestimmt. Die Analyse ergab 448,10 mg Gesamtstickstoff, also 1,93% vom Gesamtstickstoff der Lösung nach der Verdauung. Davon konnten maximal nur 103,4 mg von dem zur Verdauung verwandten Papain stammen. Es zeigte sich, daß durch die angewandte Methode der Veresterung praktisch die ganzen stickstoffhaltigen Verbindungen in Lösung gingen.

Ein Teil dieser Aminosäuren, bzw. Peptide wurden dann unter den Bedingungen der van Slyke'schen Stickstoffbestimmung desaminiert. Es wurden dadurch die freien α-Aminogruppen durch OH-Gruppen ersetzt.

Bei der Desaminierung wurden so 81,8% des Gesamtstickstoffs entfernt. Da im Clupein als Diaminosäure nur Arginin vorhanden ist, dieses aber bei dieser Desaminierung 25% des Gesamtstickstoffs verlieren würde, ist schon aus diesem zu schließen, daß fast nur Monoaminosäuren, bzw. deren Peptide in dieser Fraktion vorlagen.

Ein anderer Teil der Lösung wurde nun mittels Schwefelsäure der Totalhydrolyse unterworfen und nun wiederum nach van Slyke der α-Aminostickstoff bestimmt.

Es ergab sich so, daß 81,9% des Stickstoffs nach der Desaminierung, vor der Totalhydrolyse auf Monoaminosäuren entfiel, deren α-Aminostickstoff an der Peptidbindung beteiligt war. Die übrigen 18,1% Stickstoff kamen wohl der Iminogruppe von Prolin und Oxyprolin zu, die ja durch diese α-Amino-N-Bestimmung nicht erfaßt wird. Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß im Filtrate der PW-Säurefällung neben bloßen Monoaminosäuren auch reine Monoaminosäurepeptide vorlagen.

Die erste PW-Säurefällung wurde in verdünnter Schwefelsäure suspendiert und durch Ausschütteln mit Amylalkohol-Äther (1:1) die PW-Säure entfernt. Man erhielt auf diese Weise eine wasserklare Aminosäure-Peptidlösung, die stärkste Biurettreaktion ergab.

Die aus der ersten PW-Säurefällung erhaltene Lösung enthielt nach Entfernung der Schwefelsäure mit 22,14 gr Gesamtstickstoff

= 95,3% vom Gesamtstickstoff des Verdauungsansatzes weitaus den größten Teil an Aminosäuren und Peptiden. Die Versuche gingen nun darauf hinaus, aus diesem Gemisch durch Fällung und Fraktionierung einheitliche Peptide, wenn möglich im kristallinen Zustande zu erhalten. Über die Aufarbeitung von partiellen Spaltprodukten der Proteine in dieser Hinsicht liegen noch sehr wenig Erfahrungen vor. Da sich zeigte, daß man bei diesem Peptidgemisch über die Pikrinsäureverbindungen wohl noch am ehesten zu kristallinen Körpern gelangen kann, wurden diese Verbindungen hergestellt.

Die zur Sirupkonsistenz eingedampfte Aminosäure-Peptidlösung wurde mit einer konzentrierten Lösung von Pikrinsäure in 96%igem Alkohol gefällt. Man erhielt auf diese Weise zwei Fraktionen; eine im 96%igen Alkohol lösliche und eine darin unlösliche. Die im Alkohol unlösliche Fraktion wurde mit Aceton behandelt, wobei ein großer Teil in Lösung ging.

Versuche zeigten, daß die Löslichkeit dieser Pikrate in der Regel eine umso größere ist, je mehr alkoholische OH-Gruppen das Lösungsmittel enthält, vor allem aber auch je aktiver die OH-Gruppen sind. Ich erhielt so sehr leicht Lösung in Glycerin, auch in Phenol, besonders aber in Äthylenchlorhydrin; ziemlich leicht Lösung in Methylalkohol, ebenso in Aceton, weniger gut in höheren Alkoholen. Im Äther waren alle Produkte unlöslich.

Die verschiedensten Versuche aus diesen Pikratfraktionen kristalline Körper zu erhalten, hatten keinen Erfolg. Immer kamen schmierige Produkte heraus. Es schien dabei so zu sein, daß Lösungsmittel im Molekül festgehalten und dadurch Kristallisation verhindert wurde. Ein Beispiel wie Stoffe, die diese Verbindungen zu lösen vermögen festgehalten werden, mag folgende Beobachtung geben: Clupeinesterchlorhydrat mit Aceton gewaschen und tagelang im Vakuumexsikkator getrocknet, gab mit Nitroprussidnatrium, $(NH_4)_2SO_4$ und Ammoniak noch sehr starke Acetonreaktion. Selbst nach eintägigem Trocknen bei 120° C war diese Reaktion noch leicht possitiv. Es wurde dann daran gedacht, die freien Aminogruppen an den Benzolsulforest zu binden und wenn möglich nach Kristallisation die so erhaltenen Verbindungen, die sich durch relativ große Beständigkeit auszeichnen nach dem von S. Gurin u. H. T. Clarke (Allocation of the free amino groups in proteins and peptides J. of Biol. Chem. 107. 395. 1934.) angegebenen Verfahren zu hydrolisieren, um aus den Spaltprodukten auf den Aufbau der vorliegenden Peptide zu schließen. Da bei unseren Körpern ein Verhalten ähnlich dem des Arginins wegen des großen Argininreichtums zu erwarten war, wurden Versuche zur Benzolsulufurierung mit Arginin angestellt. Zu diesem Zwecke wurde Arginin in

n/1 NaOH unter Eiskühlung mit Benzolsulfochlorid behandelt. Es entstand dabei Dibenzolsulfoarginin. Diese Verbindung zeigte sich sehr leicht wasserlöslich, ebenso war sie im Alkohol, Aceton und Äther löslich.

Da nun das Arginin und seine Verbindungen nicht allzu beständig gegenüber Alkali sind, ferner die Benzolsulfurierung keine sehr gute Ausbeute gab, vor allem aber weil die Benzolsulfoverbindung leicht im Wasser löslich und damit schwer zu erhalten war, eignete sich dieses Verfahren nicht für die Clupeinspaltprodukte.

Bei nun von mir begonnenen Arbeiten soll versucht werden, an Hand synthetischer und isolierter Argininpeptide zu Verbindungen zu gelangen, die durch ihr Verhalten einen Wegweiser geben für die Isolierung und Erforschung dieser Körper aus den entsprechenden Verdauungsgemischen. Vielleicht wird es möglich, durch eine so geführte, planmäßige, genauere Untersuchung des Peptidgemisches weiter Aufschluß über den Aufbau des Clupeins wie auch über die Wirkung des Papains zu bekommen.

Experimenteller Teil.

Darstellung des Clupeinmethylesterchlorhydrates:

1) Darstellung der Spermatozoenköpfe:

3000 g ausgereifter Heringstestikeln werden in der Fleischhackmaschine zerkleinert und in 12 Liter Wasser suspendiert. Nach 30 Min. langem Turbinieren wird durch eine doppelte Schichte von Verbandgaze koliert. Aus dem Filtrat werden nun die Köpfe der Spermatozoen mit 300 ccm Eisessig gefällt. Es wird noch 30 Min. turbiniert und dann nach kurzem Absetzen durch mehrere Faltenfilter filtriert. Der Niederschlag wird nochmals in 12 Liter 1%iger Essigsäure suspendiert, turbiniert und wiederum abfiltriert. Zum Schluß wird der Niederschlag noch in 12 Liter bloßem Wasser aufgerührt und filtriert.

Praktisch kann der noch nasse Niederschlag gleich zu Clupeinpikrat weiter verarbeitet werden. Will man aber die Spermatozoenköpfe als haltbares Trockenpräparat bekommen, so suspendiert man den feuchten Niederschlag in 6 Liter Aceton, saugt auf der Nutsche ab und wäscht noch zweimal mit Äther nach. Nach dem Trocknen erhält man so ein fast weißes, pulverisierbares Produkt.

Ausbeute: ca 600 gr = 20% der angewandten Testikeln.

2) Darstellung des Clupeinpikrates:

500 gr der getrockneten und pulverisierten Spermatozoenköpfe werden 12 Liter Wasser suspendiert und einige Stunden stehen ge-

lassen. Man versetzt nun mit 2 n NaOH bis zur eben alkalischen Reaktion und nach 30 Min. unter gutem Turbinieren mit 50%iger Schwefelsäure bis zur gut kongosauren Reaktion. Man rührt noch 30 Min. lang und saugt dann sofort auf der Nutsche ab. Der Niederschlag wird noch fünfmal mit 12 Liter 1%iger Schwefelsäure 30 Min. lang turbiniert und abgesaugt. Dadurch ist praktisch alles Clupein als Sulfat in Lösung gegangen und es verbleibt der im wesentlichen aus Nucleinsäuren bestehende Rückstand. Die erhaltenen Filtrate werden nun mit einer gesättigten Lösung von Natriumpikrat versetzt, bis erneuter Zusatz keine Fällung mehr verursacht. Nach gutem Absitzen wird dekantiert, auf der Nutsche abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen.

Um aus diesem rohen Pikrat die in mehr oder minder großer Menge enthaltenen Purinkörper zu entfernen, wird das Pikrat in der Reibschale mit soviel n/20 NaOH verrieben, bis die Reaktion deutlich alkalisch ist. Es wird nun sofort abgesaugt und noch zweimal mit der gleichen Menge NaOH digeriert. Zum Schluß wird der Niederschlag noch mit Wasser, dann zur völligen Entfernung der Lauge mit n/20 HCl, hierauf zweimal mit Wasser nachgewaschen. Das rein gelbe Präparat wird nun an der Luft getrocknet und pulverisiert.

Ausbeute: ca 125 gr.

3) Darstellung des Clupeinmethylesterchlorhydrates:

100 gr des getrockneten Clupeinpikrates werden fein pulverisiert in 1500 ccm abs. Methylalkohol suspendiert und in die Mischung unter Eiskühlung und Rühren getrocknetes HCl eingeleitet, bis die Lösung, an einem Glasstab der Luft ausgesetzt, gerade raucht. Man läßt nun 30 Min. stehen und saugt auf der Glasfilternutsche ab. (Das Filtrat enthält Eiweißkörper von relativ viel kleinerem Molekulargewicht, als der Nd.) Der gelblich weiße Niederschlag wird nun unter Erwärmen auf dem Wasserbad in abs. Methylalkohol gelöst und in das $2^1/_2$fache Volumen abs. Äthers, der ziemlich HCl-haltig ist, unter Umschwenken eingegossen. Man erhält so eine schöne, flockige Fällung von fast weißer Farbe, die wiederum auf der Glasfilternutsche abgesaugt wird. Das Lösen in abs. Methylalkohol und Fällen durch Eingießen in HCl-haltigem Äther kann, um ein möglichst weiß aussehendes Produkt zu erhalten, noch ein bis zweimal wiederholt werden. Am Schluß wird noch gut mit abs. Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator über $CaCl_2$ getrocknet. Das so erhaltene Produkt läßt sich zu einem ganz weißen, leichten Pulver zerreiben.

Ausbeute: ca 30—45 g.

Darstellung des Fermentpräparates:

5 gr „Papain Wallerstein", ein amerikanisches Rohpräparat, werden zur Entfernung der Phosphatide in der Reibschale mit 50 ccm Äther gut verrieben, zentrifugiert, dann der Äther abgegossen. Das Ganze wird noch zweimal wiederholt und am Schluß im Vakuumexsikkator trockengesaugt. Das so mit Äther behandelte Papainpräparat wird mit 100 ccm Wasser 30 Min. lang geschüttelt und einen Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Darauf wird durch ein Faltenfilter filtriert und das Filtrat unter gutem Umschwenken mit dem vierfachen Volumen Aceton gefällt. Die schön flockige, weiße Fällung wird dann abzentrifugiert. Der Niederschlag setzt sich dabei sehr gut ab. Es wird noch mit 96%igem Alkohol aufgerührt und unter hoher Tourenzahl zentrifugiert. Man gießt dann vom Alkohol ab, rührt mit Äther auf und zentrifugiert wiederum. Es wird dann vom Äther abgegossen und das Präparat, ohne es aus der Zentrigugierhülse zu nehmen rasch im Vakuumexsikkator trockengesaugt. Nur auf diese Weise läßt sich ein Braunwerden des Präparates verhindern. Man erhält so ein weißes, pulverisierbares Produkt, das sich mit nur geringer Trübung im Wasser löst.

Ausbeute: ca 60% des Rohpräparates.

Versuchsansätze zum Vergleich verschiedener Papainpräparate:

Herstellung der Papainlösungen: Die abgewogene Menge Papain wird jeweils in der 30-fachen Gewichtsmenge Wasser gelöst, bei 30° C eine halbe Stunde stehen gelassen, dann durch ein Faltenfilter filtriert. Es wird nun mit Wasser nachgewaschen und im Meßkölbchen auf das vorgesehene Volumen aufgefüllt. (Soll die Lösung längere Zeit haltbar sein, so wird sie mit Toluol überschichtet und im Eisschrank aufbewahrt).

Versuchsreihe:

20 ccm Ansätze:

1) 10 ccm einer 8%igen Lösung von Clupeinmethylesterchlorhydrat; ph-ca 5.

2) Pufferung mit 2 ccm Acetatlösung auf ph-5,2.

3) 10 mg Cystein in 1 ccm Lösung als Aktivator.

4) 0,8 ccm der nach obiger Vorschrift hergestellten Papainlösung.

a) Papayotin Wallerstein roh: 1,85%ige Lösung.

b) „Papain Merck 1 : 350": 1,9%ige Lösung.

c) Papayotin Wallerstein durch Acetonfällung gereinigt: 1,25%-ige Lösung.

d) „Papain Merck 1 : 350" durch Alkoholfällung gereinigt: 1,25%ige Lösung.

5) Mit Wasser auf 20 ccm auffüllen.

Zur Alkoholtitration nach Willstätter wurden Portionen von je 2 ccm entnommen. (Verdauungstemperatur 40° C).

Fermentpräparat:	Aciditätszuwachs in ccm n 20 KOH	
	nach 2 Std.	nach 22 Std.
Pap. Wallerst. roh	1,22	2,87
Pap. Merck 1 : 350	1,16	2,76
Pap. Wallerst. mit Aceton gereinigt	1,33	2,95
Pap. Merck 1 : 350 mit Alkohol gereinigt	1,36	2,98

Versuche zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Verdauung.

Methodisches: Zur Ermittlung des Fortschritts der Verdauung wurde die Willstätter'sche Alkoholtitration mit alkoholischer n 20 KOH verwandt, mit Thymolphthalein (0,5%ige alkoholische Lösung als Indikator). Nur einige Versuche wurden mit der van Slyke'schen Stickstoffbestimmung ausgeführt. Verdaut wurde jeweils bei 40° C.

I) Versuchsansätze zur Bestimmung des optimalen ph mit Clupein als Substrat:

Um den Einfluß des Puffers auf das Ferment auszuschalten, wurden die Ansätze hier ohne Anwendung eines Puffergemisches, lediglich durch n/10 HCl bzw. n 10 NaOH auf die verschiedenen ph-Werte eingestellt. Aktiviert wurde mit einer frisch bereiteten Cysteinlösung. Um eine Oxydation zu Cystin und damit eine Wirkungslosigkeit des Aktivators zu verhindern, war es nötig die Versuchsansätze unter Stickstoff zu halten. Das ph wurde mit der Antimon-Luft-Kalomelelektrodenkombination gemessen.

25 ccm Ansätze:

1) 12,5 ccm 8%ige Clupeinmethylesterchlorhydratlösung.
2) Zur Einstellung des ph: n/10 HCl bzw. n/10 NaOH.
3) 1 ccm einer 1%igen Cysteinlösung als Aktivator.
4) 0,8 ccm einer Papainlösung mit 10,85 mg Ferment im ccm.
5) Mit Wasser auf 25 ccm auffüllen.

Zur Bestimmung des Fortschritts der Verdauung mittels der Willstätter'schen Alkoholtitration wurden Proben von je 2 ccm entnommen.

Ansatz Nr.	n/10 HC 1 in ccm	n/10 NaOH in ccm	ph_{20} Anfangs	ph_{20} n. 1std.	mittl. ph	Kontr. Titr.	Aciditätszuwachs in ccm n/20 KOH nach 1 std
1.	0,60	—	2,73	2,69	2,71	1,15	0,00
2.	0,30	—	3,08	2,90	2,99	1,10	0,00
3.	—	—	3,67	3,51	3,59	1,04	0,08
4.	—	0,5	4,87	4,20	4,53	1,01	0,37
5.	—	0,88	5,36	4,50	4,93	0,90	0,48
6.	—	1,12	5,66	5,08	5 37	0,83	0,49
7.	—	1,62	6,28	5,87	6,07	0,81	0,34
8.	—	2,00	6,92	6,29	6,60	0,72	0,36
9.	—	3,15	7,81	6,72	7,26	0,59	0,50
10.	—	5,00	8,67	7,02	7,84	0,45	0,60
11.	—	6,25	9,04	7,09	8,06	0,38	0,66

Die Cysteinprobe mit Nitroprussidnatrium war in allen Ansätzen bei der Titration nach einer Stunde der Verdauung noch stark positiv.

II) Versuchsansätze zur Bestimmung der Art und Menge des Aktivators:

Bestimmung der optimalen Cysteinmenge:

10 ccm Ansätze:

1) 5 ccm einer 8%igen Lösg. von Clupeinmethylesterchlorhydrat, mit NaOH auf ph ca 5,2 eingestellt.
2) 1 ccm Acetatpuffer ph-5,2.
3) 1%ige Cysteinlösg. in verschiedener Menge.
4) 0,4 ccm Papainlösg. mit 10,85 mg Ferment im ccm.
5) Mit Wasser auf 10 ccm auffüllen.

Der Fortschritt der Verdauung wurde durch die Willstätter'sche Alkoholtitration in je 2 ccm Lösung bestimmt.

Ansatz Nr.	mg Cystein	Kontr. Titr.	Aciditätszuwachs in ccm n/20 KOH		
			nach 1 std.	nach 3 std.	nach 24 std.
1.	—	0,94	0,00	0,00	0,11
2.	0,25	1,00	0,00	0,00	0,17
3.	0,50	0,91	0,21	0,25	0,73
4.	1,00	0,96	0,54	0,64	1,63
5.	2,50	0,99	0,66	0,92	1,75
6.	5,00	1,23	0,75	1,04	1,78

Vergleichende Versuche mit HCN als Aktivator konnten leider nicht mit der Alkoholtitration nach Willstätter kontrolliert werden, da die HCN bei der Titration sehr störend wirkte und nur unsichere Ergebnisse zu erhalten waren. Es mußte hier daher zur van Slyke'schen Stickstoffbestimmung gegriffen werden.

Vergleichende Versuchsansätze mit HCN als Aktivator:

25 ccm Ansätze:

1) 12,5 ccm einer 8%igen Clupeinmethylesterchlorhydratlösung, ph = ça 5,5.

2) Pufferung auf ph = 5,5 (3,0 ccm n/1 Natriumacetat mit 0,50 ccm n/1 Essigsäure).

3) Aktivator: Ansatz 1) 10 mg Cystein in 1 ccm Lösung,
Ansatz 2)—6) verschiedene Mengen einer n/1 HCN Lösung.

4) 1 ccm Papainlösung mit 10,85 mg Ferment im ccm.

5) Mit Wasser auf 25 ccm auffüllen.

Zur van Slyke'schen Stickstoffbestimmung wurden Proben von je 5 ccm entnommen.

Ansatz Nr	Cystein Lösg.	HCN-Lösg. ccm n/1	Van Slyke-Stickstoff in ccm Zunahme		
			zu Beginn	nach 3 std.	nach 24 std.
1.	1 ccm	—	1,17	3,36	4,95
2.	—	0,20	0,94	96'z	4,49
3.	—	0,60	0,98	3,42	5,42
4.	—	1,00	0,96	3,71	—
5.	—	2,00	1,42	4,11	6,75
6.	—	3,00	1,55	4,25	7,05

(Alle Stickstoffwerte auf 0° C und 760 mm Hg bezogen!)

III) Versuchsansätze zur Bestimmung der optimalen Papainmenge:

20 ccm Ansätze:

1) 10 ccm einer 8%igen Lösg. von Clupeinmethylesterchlorhydrat, mit NaOH auf ph ça 5,2 eingestellt.

2) 2 ccm Acetatpuffer, ph = 5,2.

3) 1 ccm einer 1%igen Cysteinlösg., als Aktivator.

4) Verschiedene Mengen einer Papainlösg. mit 10,85 mg Ferment im ccm.

5) Mit Wasser auf 20 ccm auffüllen.

Für die Willstätter'sche Alkoholtitration wurden Proben von je 2 ccm entnommen.

Ansatz Nr.	ccm Papain-Lösung	Aciditätszuwachs in ccm n/20 KOH nach $3^1/_2$ std.
1.	0,2	0,60
2.	0,4	0,94
3.	0,6	1,10
4.	0,8	1,19
5.	1,0	1,16
6.	1,2	1,21

Eine Anzahl seiner hier beschriebenen Verdauungsversuche wurden unter Anleitung von Herrn Dr. E. Maschmann, der mir bei der von seinem Lehrer Willstätter übernommenen, äußerst exakten Methodik in liebenswürdigster Weise behilflich war, im Georg Speyer-Haus ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Dr. E. Maschmann, sowie Herrn Geheimrat Dr. Kolle, der die Bewilligung zur Ausführung dieser Arbeiten im Paul-Ehrlich'schen Institut gab, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Verdauung des Clupeins unter den gefundenen optimalen Bedingungen:

Es wurden in folgender Reihenfolge die Lösungen zum Ansatz vereinigt:

1) 100 gr Clupeinmethylesterchlorhydrat, gelöst in 1000 ccm Wasser wurden mit n/1 NaOH auf etwa ph – 6 gebracht.

2) 100 ccm n 1 Natriumacetatlösung zur Pufferung.

3) 200 ccm n/1 HCN-Lösung als Aktivator (wurde kurz vor der Verwendung hergestellt aus 13,4 gr KCN, die mit n/1 Essigsäure bis zur lackmussauren Reaktion versetzt und mit Wasser

auf 200 ccm aufgefüllt wurden). Die HCN wirkte dabei in angenehmer Weise zugleich als Desinfiziens des Versuchsansatzes.

4) Mit n/1 Essigsäure einstellen auf ph = 5,3 (23° C).

Vor Zugabe der Fermentlösung wurde nun das so bereitete Substrat, sowie die Fermentlösung und das später zum Auffüllen zu verwendende Wasser im Thermostaten auf 40° C gebracht.

5) 100 ccm einer Papainlösung, die in 1 ccm 9,30 mg Papain enthielt.

6) Nach Zugabe des Fermentes wurde der Ansatz mit Wasser auf 2000 ccm aufgefüllt.

Kontrolle der Verdauung durch die van Slyke'sche Stickstoffbestimmung in jeweils 5 ccm der Lösung:

Zeit der Verd. in Std.	0	0,5	1	2	4	16	40	64
ccm v. Slyke-Stickstoff	3,58	6,17	6,98	8,42	8,60	9,18	10,86	11,12

(Werte auf 0° C, 760 mm Hg und Trockenheit reduziert.) Erneuter Fermentzusatz gab nach dieser Zeit der Verdauung praktisch keine weitere Hydrolyse mehr.

Nach der Verdauung wurde die ganze Lösung im Vakuum bei 12 mm Hg und 50° C Wasserbadtemperatur auf ein Drittel des Volumens eingedampft. Dadurch wurde die ganze HCN entfernt. Wegen geringer Trübung filtrierte ich durch ein Faltenfilter und füllte im Meßkolben auf einen Liter auf.

Analytische Ergebnisse:

Gesamtstickstoff in 1 ccm Lösung: 23,268 mg.

Freier α-Aminostickstoff nach van Slyke auf 1 ccm Lösung umgerechnet: 2,198 mg.

Arginin nach Totalhydrolyse in 1 ccm der Lösung (Bestimmung als Flavianat nach A. Kossel u. Staudt H. 156. 270. 1926): 65,732 mg, entsprechend = 21, 155 mg Argininstickstoff.

Abtrennung des Arginins, bzw. der Argininpeptide aus dem Verdauungsgemisch mittels der Phosphorwolframsäurefällung:

Die Lösung des Verdauungsgemisches wurde mit 25%iger Schwefelsäure gerade kongosauer gemacht, dann mit verdünnter Schwefelsäure auf das dreifache Volumen gebracht, so daß die Lösung 5% H_2SO_4 enthielt. Nun wurde mit einer 20%igen Phosphor-Wolframsäurelösung in 5 Vol.%iger Schwefelsäure unter starkem Rühren gefällt. Es wurde so lange Fällungsreagenz zugesetzt, bis eine abfiltrierte Probe bei erneuter Zugabe von PW-Säurelösung innerhalb

10 Sek. keine Fällung mehr erzeugte. Nach 24 stündigem Stehen wurde abgesaugt, der Niederschlag dreimal auf der Nutsch mit einer auf 0° C gekühlten Lösung gewaschen, die in 100 ccm 2,5 g PW-Säure und 5 ccm Schwefelsäure enthielt.

Das Filtrat gab auf Zusatz von 1000 ccm 20%iger PW-Säurelösung nochmals, aber erst nach längerem Stehen eine Fällung. Diese wurde nach zwei Tagen abfiltriert und wie der vorhergehende Niederschlag gewaschen.

Die Filtrate der PW-Säurefällungen wurden vereinigt und zur Entfernung der überschüssigen PW-Säure mit einem Gemisch von Amylalkohol-Äther 1 : 1 ausgeschüttelt. Nach Neutralisation der Lösung mit 20%iger NaOH wurde im Vakuum auf zwei Liter eingedampft und über Nacht stehen gelassen, wodurch ein großer Teil des durch die Neutralisation entstandenen Na_2SO_4 auskristallisierte. Es wurde davon abgesaugt und nach Waschen mit wenig Wasser das Filtrat im Vakuum zur völligen Trockne eingedampft. Nach dem Trocknen im Vakuum bei 100° C wurde der Rückstand mit abs. Methylalkohol verrieben und durch Einleiten von getrocknetem HCl unter Eiskühlung verestert. Nach kurzem Stehen wurde abfiltriert und das Ganze noch zweimal wiederholt. Die erhaltenen Filtrate wurden vereinigt, der Alkohol im Vakuum weggedampft, dann der Rückstand mit Wasser aufgenommen und im Meßkolben auf 100 ccm aufgefüllt.

Die Analyse ergab für die ganze Lösung berechnet 448,10 mg Gesamtstickstoff, das waren 1,93% vom Gesamtstickstoff des Verdauungsansatzes. Durch die van Slyke'sche Stickstoffbestimmung wurden hier 81,8% des Gesamtstickstoffs erfaßt. Nach Totalhydrolyse durch 16 Stunden langes Kochen mit 25%iger Schwefelsäure wurde dann wiederum der α-Aminostickstoff bestimmt. Es ergab sich, daß dann noch 81,9% des Gesamtstickstoffs nach der Desaminierung vor der Totalhydrolyse α-Aminogruppen zukam, die eben durch diese Totalhydrolyse freigemacht wurden. Somit waren im Filtrat der PW-Säurefällung noch 14,9% vom Gesamtstickstoff Peptidstickstoff. Zusammenfassend ergab sich also für das Filtrat der PW-Säurefällung:

	in mg	in % v. Ges.-N
Gesamt-N vor der Desamin. und Totalhydr.:	448	100%
Gesamt-N nach „ „ vor „	81,76	18,2%
Gesamt-N nach „ „ nach „ (Peptid-N)		
α-Amino-N nach „ „ nach „	66,8	14,9%

Um aus der ersten PW-Säurenfällung das Arginin, bzw. die Argininpeptide wieder in Lösung zu bekommen, wurde der Niederschlag auf folgende Art zersetzt:

Zersetzung des PW-Säureniederschlages:

Der erste PW-Säureniederschlag wurde in der vierfachen Gewichtsmenge 2,5%iger Schwefelsäure suspendiert und nach Donalt D. van Slyke (Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethode Abt. I, Teil 7, S. 62) durch Ausschütteln mit einem Gemisch von Amylalkohol-Äther = 1:1 die PW-Säure extrahiert. Zum Schluß wurde die wässrige Lösung filtriert. Ich erhielt eine ganz farblose, klare Lösung.

Die so aus dem Verdauungsgemisch über die erste PW-Säurefällung erhaltene Arginin, bzw. Argininpeptidlösung wurde zur Entfernung der bei der Zersetzung des Niederschlags angewandten Schwefelsäure in der Kälte langsam mit einer gesättigten Barytlösung versetzt, bis die Lösung kaum noch lackmussauer war. Nach gutem Absitzen wurde auf der Nutsche abgesaugt. Wie die Erfahrung lehrt, enthalten die Bariumsulfatfällungen aus solchen Lösungen gewöhnlich recht beträchtliche Mengen an Aminosäuren und Peptiden adsorbiert. Aus diesem Grunde wurde der Niederschlag fünfmal mit heißem Wasser aufgerührt und filtriert. Die Filtrate wurden alle vereinigt und die Lösung bei 12 mm Hg und 50° C Wasserbadtemperatur auf ca 800 ccm eingeengt. Es wurde nun durch ein gehärtetes Filter filtriert und die Lösung im Meßkolben auf 1000 ccm aufgefüllt. Die Gesamtstickstoffbestimmung ergab in 1 ccm Lösung 22,14 mg Stickstoff. Die ganze Lösung enthielt somit 22,14 gr Stickstoff = 95,3% vom Gesamtstickstoff des ganzen Verdauungsansatzes. Die α-Aminostickstoffbestimmung nach van Slyke ergab auf 1 ccm Lösung umgerechnet 2,05 mg α-Aminostickstoff = 9,25% vom Gesamtstickstoff. N: NH_2 = 10,8. Arginingehalt in 1 ccm der Lösung = 38,162 mg. Dies entspricht = 12,43 mg Argininstickstoff = 91,2% vom Gesamtstickstoff.

Die so erhaltenen Argininpeptide, bzw. Arginin wurden nun mittels gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung in die Pikrate verwandelt.

Herstellung der Pikrate:

Die Arginin bzw. Argininpeptidlösung wurde im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Es wurde nun mit etwas 96%igem Alkohol aufgerührt, dann unter ständigem Rühren kleine Portionen einer gesättigten, alkoholischen Pikrinsäurelösung zugegeben. Man erhielt so einen immer zäher werdenden Brei, der sich am Schluß kaum mehr rühren ließ. Ich goß von der alkoholischen Lösung ab. Die zähe Fällung wurde einige Male in der Reibschale mit Aceton, dem etwas Pikrinsäure zugesetzt war, verrieben, wobei ein krümeliges, sich orange färbendes Produkt erhalten wurde. Es wurde

abgesaugt, mit Aceton, dann mit Äther nachgewaschen und im Vakuumexsikkator über P_2O_5 getrocknet. Das Filtrat und die vorher erhaltene alkoholische Pikratlösung wurden im Vakuum zur völligen Trockne eingedampft. Alle drei auf diese Weise erhaltenen Pikratfraktionen wurden schon nach kurzem Stehen an der Luft schmierig.

Zusammenfassung: Nach einer neuen, schonenden Methode wurde ein von Purinkörpern freies Clupeinpräparat hergestellt.

Das rohe „Papain Wallerstein" wurde über die Acetonfällung gereinigt und die optimalen Bedingungen für die Clupeinverdauung durch Papain ausfindig gemacht.

Clupein unter den gefundenen optimalen Bedingungen verdaut, wurde dann durch Phosphorwolframsäure gefällt und dadurch alle entstandenen Monoaminosäuren, sowie Monoaminosäurepeptide vom Arginin und Argininpeptiden getrennt. Es wurde weiter versucht, bei den durch diese Fällung abgetrennten Verbindungen über die Pikrate zu einheitlichen, kristallinen Körpern zu gelangen.

Lebenslauf.

Am 29. Juli 1910 wurde ich zu Lichtenfels als Sohn des Werkmeisters Heinrich Schuberth und seiner Ehefrau, geb. Reinhardt geboren. Nach Besuch der Volksschule in Ingolstadt an der Donau trat ich 1922 in die Oberrealschule dortselbst ein und machte im Februar 1931 mein Abitur. Im Frühjahr gleichen Jahres zog ich dann auf die Technische Hochschule zu München und wandte mich dem Studium der Chemie zu. Nach fünf Semestern machte ich mein chemisches Diplomvorexamen. Ab 1. November 1933 setzte ich mein Studium an der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München fort, wo ich nach weiteren drei Semestern das zweite Verbandsexamen machte. Ich arbeitete dann im chemischen Laboratorium der II. Mediz. Universitäts-Klinik Münchens bei Professor Dr. K. Felix und siedelte nach dessen Versetzung nach Frankfurt am Main ebenfalls an die Universität dortselbst über.

Meine bisherigen Lehrer für mein Chemiestudium waren: An der Technischen Hochschule zu München: Geheimrat Prof. Dr. Manchot, Geheimrat Prof. Dr. Zenneck, Geheimrat Prof. Dr. Hans Fischer, Prof. Dr. Bucherer, Prof. Dr. Lüers, Prof. Dr. Steinmetz, Prof. Dr. Boas, Prof. Dr. Zerkowitz, Prof. Dr. Funk.

An der Universität zu München: Geheimrat Prof. Dr. Wieland, Geheimrat Prof. Dr. Frank, Prof. Dr. Fajans, Prof. Dr. Schmidt, Prof. Dr. Felix.

gez. Hanns Schuberth.